
(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 100246128 B1
(44)Date of publication of specification: 03.12.1999

(21)Application number: 1019970030696
(22)Date of filing: 02.07.1997
(30)Priority: ..

(71)Applicant: KOREA INSTITUTE OF
SCIENCE AND
TECHNOLOGY
(72)Inventor: HONG, HYO JEONG
HYUN, BYEONG HWA
JIN, EUN HUI
KIM, HUI SEON
KIM, MYEONG SU
KIM, YUN GYU
RYU, CHUN JE

(51)Int. Cl C07K 16/08

(54) MOUSE MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST PRE-S1, SURFACE ANTIGEN OF HEPATITIS B VIRUS,
AND HYBRIDOMA CELL LINE PRODUCING THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is a monoclonal antibody, KR127, binding to a surface antigen of hepatitis B virus, pre-S1. And a hybridoma cell line producing the same and its preparation method are also provided. The monoclonal antibody neutralizes of a subtype of and a mutant of hepatitis B virus and is thus used in preventing and curing the infection of hepatitis B virus. CONSTITUTION: A mouse monoclonal antibody, KR 127,(KCTC 0289BP) specifically recognizes epitope including 43-49 amino acid of Pre-S1. The hybridoma cell line is prepared by the following steps of: (a) immunizing a mouse by coupling pre-S1 to keyhole limpet hemocyanin; (b) fusing the spleen cell of the mouse to a myeloma cell; and (c) selecting a hybridoma cell producing the monoclonal antibody.



COPYRIGHT 2001 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (19970702)
Notification date of refusal decision (00000000)
Final disposal of an application (registration)
Date of final disposal of an application (19990929)
Patent registration number (1002461280000)
Date of registration (19991203)

Number of opposition against the grant of a patent ()
Date of opposition against the grant of a patent (00000000)
Number of trial against decision to refuse ()
Date of requesting trial against decision to refuse ()
Date of extinction of right ()

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C07K 16/08

(11) 공개번호 특1999-008649
(43) 공개일자 1999년02월05일

(21) 출원번호 특1997-030696
(22) 출원일자 1997년07월02일
(71) 출원인 한국과학기술연구원 박원훈
서울특별시 성북구 하월곡동 39-1번지
(72) 발명자 홍효정
대전광역시 유성구 가정동 237 케이아이티아파트 15동 401호
류춘제
대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 136동 1203호
김윤규
인천광역시 부평구 부개동 일신주공아파트 107동 1206호
김희선
전라북도 전주시 완산구 효자1동 639 거성소라아파트 1401호
현병화
대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 131동 1401호
김명수
대전광역시 유성구 궁동 다솔아파트 102동 308호
진은희
대전광역시 동구 가양2동 45-19 23동 4반
(74) 대리인 이원희

심사청구 : 있음

(54) 비형 간염 바이러스의 표면항원 프리-S1에 대한 생쥐 단일클론항체, 이를 생산하는 하이브리도마 세포주 및 그의 제조방법

요약

본 발명은 B형 간염 바이러스 (HBV)의 표면항원 프리-S1 (pre-S1)에 결합하는 단일클론항체, 이를 생산하는 하이브리도마 세포주 및 그의 제조방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 HBV 표면항원 프리-S1의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프를 특이적으로 인식하는 생쥐 단일클론항체에 관한 것으로서, 이는 여러 아형 및 변이 HBV를 중화시킬 수 있어 HBV 감염을 예방하고 치료하는데 널리 사용될 수 있다.

대표도

도 1a

영세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 단일클론항체 KR127의 에피토프를 결정하기 위하여 GST-preS1 융합 단백질을 대장균에서 발현시키고 전체 단백질을 12.5% SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동하여 (a), 웨스팅블릿한 (b) 결과를 나타낸 것이고,

레인 1 : GST; 레인 M : 표준 단백질

레인 2 : GST-preS1(1-11); 레인 3 : GST-preS1(1-20);

레인 4 : GST-preS1(1-28); 레인 5 : GST-preS1(1-35);

레인 6 : GST-preS1(1-42); 레인 7 : GST-preS1(1-49);

레인 8 : GST-preS1(1-56)

도 2는 본 발명의 단일클론항체 KR127의 항원 결합 친화도를 그래프로 나타낸 것이고,

도 3은 본 발명의 단일클론항체 KR127 가 B형 간염 바이러스 (HBV)와 결합하는 능력을 면역침강으로 확인한 것이고,

NC : 음성 대조군

도 4는 본 발명의 단일클론항체 KR127 가 여러 아형 및 변이 HBV 와 결합하는 능력을 확인하기 위하여 여러 아형의 GST-preS1(1-56) 융합 단백질을 대장균에서 발현시키고 전체 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동하여(a) 웨스턴블롯한(b) 결과를 나타낸 것이다.

레인 1 : GST; 레인 M : 표준 단백질;

레인 2 : adr 아형의 프리-S1(1-56);

레인 3 : adw 아형의 프리-S1(1-56);

레인 4 : ayw 아형의 프리-S1(1-56);

레인 5 : 25번째 아미노산이 루신으로 치환된 adr 아형의 프리-S1(1-56)

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 B형 간염 바이러스 (hepatitis B virus; 이하 HBV 라고 약칭함)의 표면항원 프리-S1 (pre-S1)에 결합하는 단일클론항체, 이를 생산하는 하이브리도마 세포주 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

보다 상세하게는, 본 발명은 HBV 표면항원 프리-S1 의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프를 특이적으로 인식하는 생쥐 단일클론항체에 관한 것으로서, 이는 여러 아형 및 변이 HBV 를 중화시킬 수 있어 HBV 감염을 예방하고 치료하는데 널리 사용될 수 있다.

B형 간염 바이러스 (HBV)는 사람에 침입하여 만성 및 급성 간염을 일으키고, 악화될 경우 간경화와 간암의 원인이 되는 병원체로서, 전세계적으로 3억명에 이르는 사람이 감염된 것으로 추산된다 (Tiollais Buendia, Sci. Am., 264: 48, 1991).

HBV 에 감염된 경우, 특히 HBV 양성인 모친으로부터 태어나는 신생아, HBV 에 노출된 의료기관 종사자 또는 HBV 관련 간질환으로 인해 간이식 수술을 받은 환자에서 HBV 감염을 방지하기 위해 HB 면역 글로불린 (HB immunoglobulin, HBIG)이 사용되고 있다 (Beasley, et al., Lancet, 2: 1099, 1983; Todo, et al., Hepatol., 13: 619, 1991). 그러나 현재 사용되는 HBIG 는 월장으로부터 추출되기 때문에, 특이도 (specificity)가 낮고 오염원에 노출되어 있으며, 이를 대량 생산하는데 사람 혈액의 계속적인 공급이 필요하다는 단점이 있다. 이러한 단점은 HBV 의 표면항원에 대한 단일클론항체를 개발하여 사용하면 극복할 수 있다.

HBV 의 피막은 3개의 단백질로 구성되는데, 구체적으로 S 항원을 포함하는 주(major) 단백질, S 항원과 프리-S2 항원을 포함하는 중(middle) 단백질 및 S 항원, 프리-S2 항원과 프리-S1 항원을 포함하는 대 (large) 단백질로 구성된다 (Neurath, A. R. and Kent, S. B. H., Adv. Vir. Res., 34: 65-142, 1988). 이 모든 표면항원 단백질들은 HBV 를 중화시키고 무력화하는 항체를 유도하며, 특히 프리-S 부위에 의해 유도되는 항체는 바이러스의 제거 및 급성 HBV 감염에서의 회복과 관련이 있고 S항원에 대한 무면역반응 (Non-responsiveness)을 극복할 수 있다 (Iwarson, S. et al., J. Med. Virol., 16: 89-96, 1985; Itoh, Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 9174-9178, 1986; Neurath, A. R. et al., Vaccine, 7: 234-236, 1989; Budkowska, A. et al., J. Med. Virol., 20: 111-125, 1986; Milich, D. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 8168-8172, 1985; Neurath, A. R. et al., J. Med. Virol., 17: 119-125, 1985; Milich, D. R. et al., J. Immunol., 137: 315-322, 1986). 특히 프리-S1 단백질의 21-47번 아미노산 부위는 사람 간세포의 HBV 수용체와 결합하여 바이러스가 간세포에 감염하는데 결정적인 역할을 하므로, 이 부위에 특이한 단일클론항체는 바이러스 중화에 매우 중요한 역할을 할 수 있다 (Neurath, et al., Cell, 46: 429, 1986; Pontisso, et al., Virol., 173: 533, 1989; Neurath, et al., Vaccine, 7: 234, 1989).

이에 본 발명자들은 글루타티온-S-전이효소와 결합한 GST-pre-S1 융합 단백질을 이용하여 프리-S1 펩타이드를 얻고 이에 키홀 림펫 헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin, 이하 KLH 라고 약칭함)을 결합시켜 쥐에 주사함으로써 하이브리도마 세포주를 제조하고, 이로부터 프리-S1 과 결합하는 단일클론항체를 분리하여 43-49번 아미노산 위치를 포함하는 에피토프를 인식함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 B형 간염 바이러스 (HBV)의 표면항원 프리-S1 에 결합하는 생쥐 단일클론항체, 이를 생산하는 하이브리도마 세포주 및 그의 제조방법을 제공함에 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 HBV 표면항원 프리-S1 에 KLH 를 결합시켜 생쥐에 면역시키는 과정으로 하이브리도마 세포주를 제조하고, 이로부터 프리-S1 의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프를 인식하는 생쥐 단일클론항체를 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 B형 간염 바이러스 (HBV)의 표면항원 프리-S1 부위를 인식하는 단일클론항체를 얻기 위하여, 우선 프리-S1의 아미노 말단 56개 아미노산으로 구성된 펩타이드를 제조한다.

본 발명자들은 HBV 표면항원 프리-S1의 아미노 말단 56개 아미노산을 암호하는 유전자를 글루타티온-S-전이효소 (glutathione-S-transferase, GST) 유전자와 결합시켜 대장균에서 수용성인 융합 단백질 형태로 상기 프리-S1 단백질을 대량 발현시킨 바 있다 (한국특허출원 95-9865호).

상기의 방법으로 얻은 융합 단백질로부터 얻은 프리-S1 펩타이드를 KLH (keyhole limpet hemocyanin)와 결합시킨 다음 그의 항원성이 프리-S1 펩타이드 단독보다 큼을 확인하여 본 발명은 KLH-pre S1 융합 단백질을 생쥐를 면역시키는데 사용한다. 다음 상기 항원으로 면역된 생쥐의 비장세포와 마이엘로마 세포를 기존의 방법으로 융합시킨 다음 프리-S1 펩타이드에 특이성을 보이는 클론을 간접 엘리자 방법 등으로 선별한다. 이들중 이소타입이 IgG 인 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 선별하고 안정하게 항체를 분비하는 세포는 계속 계대배양한다. 그 결과 프리-S1의 에피토프에 특이성이 있는 본 발명의 단일클론 항체 KR127 (수탁번호 : KCTC 0289 BP)를 생산하는 하이브리도마 세포주를 선별하였다.

본 발명은 상기 하이브리도마 세포주에서 생산되는 단일클론항체 KR127가 반응하는 정확한 프리-S1 부위의 에피토프를 결정하기 위하여, 프리-S1 유전자를 포함하는 발현 플라스미드를 이용하여 프리-S1 유전자의 3'-말단의 일부가 절단된 다양한 플라스미드 벡터를 제조한다.

구체적으로 플라스미드 벡터 pGSTpreS1-56에 존재하는 프리-S1 유전자를 3'-말단부터 절단하여 프리-S1 부위의 1-11번, 1-20번, 1-28번, 1-42번, 1-49번, 1-56번 아미노산 등을 암호하는 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터를 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)으로 제조하고, 이를 이용하여 다양한 크기의 프리-S1 펩타이드를 생산한다.

상기에서 발현시킨 펩타이드들을 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동하여 웨스턴 블롯을 수행한 결과, 본 발명의 단일클론항체 KR127은 프리-S1 부위의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프를 인식함을 확인한다 (도 1 참조).

본 발명은 상기 단일클론항체 KR127를 이용하여 항체 결합능 및 항원 결합 친화도 등을 간접 엘리자 방법으로 조사하고 (도 2 참조), HBV 입자 면역 침강을 서던 블롯으로 분석한다 (도 3 참조).

또한 본 발명은 상기 단일클론항체 KR127가 다양한 HBV 아형 및 변이체와 결합함을 확인하기 위하여, 다양한 아형의 HBV 프리-S1 변이체를 제조하고 이를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행한다 (도 4 참조). 그 결과 본 발명의 단일클론항체는 adr 아형을 포함한 adw, ayw 아형 등 전반적인 HBV에 대하여 우수한 면역 활성을 나타낸다.

이하 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1 프리-S1 아미노 말단 56개 아미노산으로 구성된 펩타이드의 제조

플라스미드 벡터 pGSTpreS1-56 (KCTC 8645P)를 포함하는 대장균 BL21(DE3)을 1 리터 LB 배지에서 흡광도 (OD)가 0.5 되도록 배양하고, 이에 0.1 mM IPTG를 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 배양한 다음 4000 x g에서 10분 동안 원심분리하고 침전물을 회수하여 트리스 완충액 (50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1mM PMSF, 0.02% NaN₃) 20ml에 녹였다. 이 현탁액에 초음파를 처리하여 세포를 파쇄하고 12000 x g에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다.

상기에서 발현시킨 융합 단백질로부터 프리-S1 단백질을 정제하기 위하여, 우선 트리스 완충액으로 평형시킨 글루타티온-아가로스 칼럼 (Sigma사, 미국)에 상기 파쇄된 세포의 상층액을 적용하고, 5mM 환원형 글루타티온액으로 흘려주어 결합된 융합 단백질을 회수하였다. 다음 상기 융합 단백질 50 µg을 분해 완충액 (50mM Tris-HCl, pH8.0, 150mM NaCl, 2.5mM CaCl₂) 50 µl에 녹이고, 트롬빈 0.2 µg을 첨가하여 상온에서 2시간 동안 반응시킨 다음 상기의 글루타티온-아가로스 칼럼에 적용하여 칼럼에 결합하지 않은 프리-S1 펩타이드를 융합 단백질로부터 분리하였다.

실시예 2 KLH-preS1 단백질의 제조

실시예 1에서 얻은 프리-S1 펩타이드 0.55mg (0.09 µM)을 50mM 인산완충액 (pH 8.6)에 녹이고, 0.025mg (0.18 µM) 2-이미노티올레인 (2-iminothiolane)을 첨가하여 상온에서 3시간 동안 반응시켰다. 이 반응액을 세파덱스 G-25 칼럼에 적용하여 부산물을 제거한 다음, 말레이미드로 활성화시킨 KLH (maleimide activated KLH: keyhole limpet hemocyanin, Pierce사 제품) 1mg을 첨가하여 상온에서 2.5시간 동안 반응시키고, 50mM 트리스-염산 완충액 (pH 7.4)을 사용하여 2일 동안 투석하였다. 그 투석액을 세파크릴 S-200 컬럼에 로딩하고, 트리스-염산 완충액 (50mM Tris-HCl, pH7.4, 1mM EDTA, 0.2mM PMSF, 0.5M NaCl, NaN₃ 0.02%)으로 KLH와 결합한 프리-S1 단백질을 (KLH-preS1)을 용출하였다.

상기에서 얻은 용출액을 단백질 정량 키트인 BCA 키트 (피어스사 제품)를 사용하여 정량한 결과, 최종 단백질 농도는 0.175 mg/ml 이었고 이로부터 총 1.7ml의 항원을 얻었다.

실시예 3 KLH-preS1 단백질의 항원성 조사

실시예 2에서 제조한 KLH-preS1 단백질 1 µg, KLH 1 µg, 실시예 1에서 제조한 프리-S1 펩타이드 100ng을 각각 엘리자 플레이트 웰에 코팅 완충액을 사용하여 고정시켰다. 이에 프리-S1 단백질의 아미노 말단 1 - 20번 아미노산 부위에 대한 에피토프를 인식하는 단일클론항체 1B3 (Kim, et al., Korean J. Immunol., 18 : 367, 1996)를 웰당 1.5-100 ng을 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 0.05% 트윈 20을 첨가한 인산완충액으로 플레이트를 세척하고, 항-생쥐 IgG-HRP (Sigma사 제품)와 반응시킨 다음, OPD (o-phenylenediamine)와 과산화수소가 포함된 기질 용액을 첨가하고, 492nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 표 1에 나타난 바와 같다.

[표 1]

1B3(ng) 면역원	0	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100
KLH	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
KLH-preS1	0.05	0.2	0.29	0.58	0.81	1.18	1.6	2.2
preS1	0.05	0.09	0.13	0.19	0.32	0.55	0.85	1.27

KLH 만을 고정하면 흡광도가 증가하지 않은 반면 프리-S1 단백질과 KLH-pre-S1 단백질은 농도가 증가함에 따라 흡광도가 증가하므로, KLH-pre-S1 단백질은 면역원으로 작용함을 확인하였다. 특히 KLH 를 결합시키는 경우에는 반응성이 증가하므로 본 발명은 KLH 를 결합시키는 실험을 이용하였다.

실시에 4 생쥐 단일클론항체 KR127 의 제조

실시에 2 에서 제조한 KLH-pre-S1 단백질 20 μ g 와 동일 부피의 항원성 증강제 (Hunter's Titer Max adjuvant, Sigma사 제품)를 혼합하고, 이를 10주된 암컷 Balb/c 생쥐의 복강과 피하에 각각 17.5 μ g 및 8.7 μ g 씩 주사한 다음 이 과정을 한달 간격으로 4회 반복하였다. 4차 복강 주사를 한 다음 높은 항체 역가를 보이는 생쥐를 세포 융합용으로 선발하였다.

피더 (feeder) 세포를 채취하기 위하여, 세포 융합 하루전에 건강한 생쥐의 복막에 0.34M 농도의 설탕 용액 8 ml 을 가하고, 이는 다시 빨아내어 복강 내에 있는 세포를 채취한 다음 원심분리하고 HAT 배지 (GIBCO사 제품)에 부유하여 웰당 만개의 세포가 되도록 96-웰 플레이트에 분주하고 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 또한, 2주전부터 비장세포와 융합할 SP2/0-Ag14 마이엘로마 세포주도 IMEM (GIBCO사 제품)과 10% 소태아 혈청을 섞어 만든 배지에서 배양하였다.

상기에서 선발한 생쥐에서 비장을 꺼내 DMEM (GIBCO사 제품)으로 잘 씻고 유리봉으로 페트리 디쉬에서 잘 분쇄한 다음 세포 부유물을 15ml 튜브에 방치하여 찌꺼기가 가라앉으면 상층액을 새로운 튜브로 옮겨두었다. 또한, SP2/0-Ag14 마이엘로마 세포주도 원심분리하여 수확하고 10 ml DMEM 에 현탁하여 위의 비장세포와 함께 세포수를 측정하였다. 천만개의 SP2/0-Ag14 마이엘로마 세포와 일억개의 비장세포를 50ml 튜브에 옮겨 섞은 다음 200 x g 로 5분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하고 37 $^{\circ}$ C 물에 담겨진 비이커에 2분 동안 방치하였다. 또한, 튜브는 가볍게 쳐서 세포를 부드럽게 만들고 37 $^{\circ}$ C 물에 담긴 상태로 천천히 흔들면서 1ml 의 PEG 용액 (GIBCO사 제품)을 1분 동안 가하였다. 다음 100 x g 로 2분 동안 원심분리하고 5ml DMEM 용액을 3분에 걸쳐 서서히 넣고 다시 5 ml의 DMEM 용액을 2분에 걸쳐 서서히 넣은 다음 200 x g 로 원심분리하여 세포들을 회수하고 30 ml 의 HAT 배지에 조심스럽게 현탁하였다. 이를 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기에서 30분 동안 방치한 다음 미리 배양하여 둔 피더 세포가 깔린 96-웰 플레이트에 웰당 100 μ l 씩 분주하고 4일 후 70 μ l HAT 배지를 더하여 2주 이상 키우면서 자라는 클로니를 관찰하였다.

프리-S1 단백질에 특이성을 보이는 클론을 선발하기 위하여 간접 엘리자 방법을 사용하였다. GST-preS1-56 융합단백질을 웰당 1 μ g씩 코팅한 플레이트에 하이브리도마 배양액 100 μ l 을 가해 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시키고 다시 HRP (horseradish peroxidase, Sigma사 제품)가 결합된 항-생쥐 IgG 또는 IgM 의 1/1000 희석액과 1시간 더 반응시켰다. 0.05% 트윈 20 을 첨가한 인산완충액으로 플레이트를 세척하고, OPD (Sigma사 제품)과 H₂O₂가 포함된 기질용액을 첨가하여, 492nm 에서 흡광도를 측정하였다.

프리-S1에 대한 특이성을 보이는 하이브리도마 세포주를 선발한 다음, 샌드위치 엘리자 방법으로 이소타이핑 키트 (Isotyping kit, BM사, 독일)를 사용하여 그들의 이소타입을 결정하고, 이들중 IgG 형 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주들을 선발하였다. 그 결과는 표 2 에 나타난 바와 같다.

[표 2]

클론	이소타입
KR1	IgG2a, k
KR2	IgG1, k
KR3	IgG1, k
KR4	IgG1, k
KR5	IgG, k
KR6	IgG2a, k

이중 비교적 안정하게 항체를 분비하는 클론 KR1 을 계속 계대배양하며 웰당 0.2개 세포가 들어가게 하는 희석방법으로 세포를 서브클로닝하여, 확실하게 안정성을 유지하고 프리-S1 에피토프에 대한 특이성을 유지한 단일클론항체 KR127 를 선발하였다. 본 발명은 단일클론항체 KR127 만을 선택하여 그 특성을 다양한 과정으로 조사하였다.

본 발명의 단일클론항체 KR127 를 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행에 1996년 12월 19 일자로 수탁번호 KCTC 0289BP 로 기탁하였다.

실시에 5 단일클론항체 KR127 의 에피토프 결정

실시에 1 의 플라스미드 벡터 pGSTpreS1-56 내 프리-S1 유전자를 3'-말단부터 일부 절단하여 프리-S1 부

위의 1-11번, 1-20번, 1-28번, 1-35번, 1-42번, 1-49번, 1-56번 아미노산을 암호하는 유전자를 함유하도록 PCR 방법으로 7개의 플라스미드 벡터를 제조하였다.

이 때 5'-말단의 경우 프라이머로는 모두 하기 서열을 가지는 올리고 뉴클레오티드를 사용하였다.

5'-CGAGGATCCATGGGAGGTTGGTCTTCC-3'

또한, 3'-말단의 경우는 각각 하기 서열을 가지는 올리고 뉴클레오티드를 사용하였다.

11번째까지는 5'-CGTGAATTCGCTTGTCTGAGGTTTGA-3',

20번째까지는 5'-GCTGAATTCATTGGGAACAGAAAGATT-3',

28번째까지는 5'-GCTGAATTCGTGATCGGGAAGAATCC-3',

35번째까지는 5'-GCTGAATTCCTCGAACGCAGGGTCCAA-3',

42번째까지는 5'-GCTGAATTCATCTGGATTGTTGAGTT-3',

49번째까지는 5'-GCTGAATTCCTTGTGGGGTTGAAGTC-3',

56번째까지는 5'-CCGAATTCATTTCCGTCTGGCCAGTG-3'

이렇게 만들어진 플라스미드 벡터를 CaCl_2 방법으로 대장균 DH5 α 에 형질전환시킨 다음 LB 배지에서 배양하였다.

각각의 대장균으로부터 실시예 1의 방법으로 융합 단백질의 발현을 유도하고, 12.5% SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)한 다음 (도 1a 참조), 상기 단일클론항체 KR127 를 사용하여 웨스턴 블롯하였다 (도 1b 참조).

도 1에 나타난 바와 같이 단일클론항체 KR127 는 프리-S1 의 아미노산 1-20번 까지의 펩타이드가 융합된 GST-preS1(1-20) 단백질까지에는 결합하지 않고 (레인 1-2), 프리-S1 의 아미노산 1-28번까지의 펩타이드가 융합된 GST-preS1(1-28)부터는 결합하는 것으로 보아 (레인 3-8), 단일클론항체 KR127 의 에피토프는 프리-S1 의 21-28번 아미노산 위치를 포함하는 것을 알 수 있었다.

실시예 6 단일클론항체 KR127 의 항원 결합능 조사

단일클론항체 KR127 를 PFMHII (Gibco사 제품) 배지에서 1주일 동안 배양하여 프로테인-G 친화 크로마토그래피 (Protein G-affinity chromatography)로 분리·정제한 다음, GST-pre-S1 융합 단백질 1 μg 을 엘리자 플레이트에 결합시키고 다음과 같은 여러 농도의 단일클론항체 KR127 를 반응시켜 항-생쥐 IgG-HRP 를 사용한 간접 엘리자 방법을 수행하여 항원 결합능을 측정하였다. 그 결과는 표 3 에 나타난 바와 같다.

[표 3]

KR359 (ng)	0	0.25	0.5	1	2	4	6	8	10	12	15	20	40	80	100	200
A492	0.11	0.18	0.23	0.36	0.67	1.02	1.31	1.58	1.63	1.79	2.02	2.37	3.12	3.29	3.30	3.52

표 3 에 나타난 바와 같이 단일클론항체 KR127 는 GST-preS1 단백질 4 ng 에 결합하여 492nm 에서 흡광도 1.02 을 나타내었다.

실시예 7 단일클론항체 KR127 의 항원 결합 친화도 조사

단일클론항체 KR127 4ng 을 다음과 같은 여러 농도의 프리-S1 경쟁 항원과 결합시킨 다음, 이 혼합물을 1 μg 프리-S1 항원이 코팅된 웰에 가하고 간접 엘리자 방법을 수행하여 친화도를 측정하였다 (도 2 참조).

도 2 에 나타난 바와 같이 단일클론항체 KR127 의 프리-S1 펩타이드에 대한 친화도는 약 $1.7 \times 10^8 / \text{M}$ 으로 나타났다.

실시예 8 단일클론항체 KR127 의 HBV 입자 면역 침강 조사

HBV 를 준비하기 위하여 이미 제조된 바 있는 adr 아형의 HBV 게놈 DNA 를 갖는 플라스미드 벡터 pHBV5.2 (Ryu, et al., J. Med. Virol., 52: 226-233, 1997) 30 μg 을 일렉트로포레이션 (electroporation) 방법으로 3×10^7 개의 HepG2 세포에 감염시키고, H 배지에서 15일 동안 배양하였다. 이 배양액에 최종 농도 6% 가 되도록 PEG 6000 을 첨가하고 4°C 에서 12시간 동안 반응시켜 HBV 를 침전시키고, 10000 $\times g$ 에서 30분 동안 원심분리하였다. 바이러스 입자를 25% 소태아 혈청을 첨가한 인산완충액 1/50 부피에 현탁시키고, 영하 70°C 에서 보관하였다.

단일클론항체 KR127 10 μg 을 프로테인 A-아가로스 (protein A-agarose, 파마시아사 제품)에 결합시키고, 상기의 바이러스 입자와 혼합하여 실온에서 하루밤 동안 반응시켰다. 이를 인산완충액으로 5회 세척한 다음, tRNA 10 μg 을 면역복합물에 첨가하고, 바이러스 DNA 를 허트 (Hirt) 방법으로 추출하였다 (Hirt, J. Mol. Biol., 26 : 365, 1967). 바이러스 DNA 는 방사능으로 표지한 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ HBV 게놈 DNA 를 프로브로 서던 블롯하여 분석하였다. 그 결과, 원형 (Relaxed Circular) 형태의 HBV 게놈 DNA 밴드를 관찰하여 (도 3 참조), 단일클론항체 KR127 가 HBV 입자에 결합하여 HBV 를 면역침강시킴을 확인하였다.

실시예 9 단일클론항체 KR127 의 HBV 여러 아형에 대한 결합능 조사

본 발명의 단일클론항체 KR127 의 여러 아형의 HBV 에 대한 결합능을 조사하기 위하여, GenBank 라이브러리에 수록되어 있는 여러 변종의 HBV 프리-S1의 아미노산 서열을 조사하여 다음과 같이 나열하였다.

D23680(adr) 20 NPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWP 53
 X14193(adr) 20 -----R-- 53
 A32621(adw) 20 -----Q-- 53
 M74498(adw) 20 -----I-- 53
 A32626 20 -----V-----I-- 53
 X01587 65 -----H----- 98
 S81946(adr) 20 -----L----- 53
 A32624 20 -----V-D-- 53
 U55223(ayw) 7 TS-----R-----T-- 42
 A32622(ayw) 7 TS-----R-TA-----T-- 42

단일클론항체 KR127 에 존재하는 HBV 의 다른 아형이나 변이체에 대한 항원 결합 능력을 조사하기 위하여, adr, adw, ayw, 그리고 adr 아형중의 25번째 아미노산 페닐알라닌이 루신으로 치환된 프리-S1 변이체의 각각 첫 번째 아미노산부터 56번째 아미노산까지를 포함하는 DNA 를 PCR 에 의하여 합성하였다. 이 때 사용한 프라이머의 염기 서열과 주형으로 사용한 플라스미드 DNA 는 표 4 에 나타난 바와 같다.

[표 4]

	주형 DNA	5' 프라이머	3' 프라이머
adr 아형	pHBV315	5'-CGAGGATCCATGGGAGGTTGGTCTTCC-3'	5'-CCGAATTCATTTCGGTCTGGCCAGTG-3'
adw 아형	pAM6	5'-CGAGGATCCATGGGAGGTTGGTCTTCC-3'	5'-CCGAATTCGTTGGCTGCTGGCCAGTG-3'
ayw 아형	pREP8-pre S1	5'-CGGAATTCATATGGGGACGAATCGGGCC-3'	5'-CCGAATTCGTTGGCGTCTGGCCAGGT-3'
adr (F→L)아형	pHBV315	5'-CGAGGATCCATGGGAGGTTGGTCTTCC-3' 5'-AATCCTCTGGGATTCTTCCCGATCACCAG-3' (변이 프라이머)	5'-CCGAATTCATTTCGGTCTGGCCAGTG-3' 5'-CTGGTGATCGGGAAGGAATCCAGAGGATT-3' (변이 프라이머)

상기 각 프리-S1 변이체에 대한 DNA 를 실시예 1 의 플라스미드 벡터 pGSTpreS1-56 의 클로닝 위치에 들어있는 프리-S1 DNA 와 치환시켜 삽입시키고 대장균에 형질전환시킨 다음 실시예 1 과 동일한 방법으로 융합 단백질의 생산을 유도하였다. 이 재조합 대장균의 세포 추출물들을 각각 12.5% SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 분석한 다음 (도 4a 참조), 니트로셀룰로스 막으로 옮겨서 단일클론항체 KR127 로 웨스턴 블롯하였다 (도 4b 참조).

그 결과 도 4 에 나타난 바와 같이 단일클론항체 KR127 는 다른 아형 및 변이체 바이러스의 프리-S1 항원에 잘 결합하고 있음을 나타내고 있다. 따라서 본 발명의 단일클론항체 KR127 (KCTC 0289BP)는 adr 아형은 물론, adw, ayw 등 전반적인 HBV 모두에 대하여 우수한 면역 활성을 나타냄을 확인하였다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 단일클론항체는 프리-S1 펩타이드의 특정 아미노산 부위를 인지하여 바이러스를 중화시킬 뿐만 아니라 다양한 아형 및 변이체 HBV 감염으로 유발되는 각종 질환의 예방 및 치료에 널리 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

B형 간염 바이러스 (HBV)의 표면항원 프리-S1 (pre-S1)의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프를 인식하는 단일클론항체 KR127 (수탁번호 : KCTC 0289BP).

청구항 2

제 1항의 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주.

청구항 3

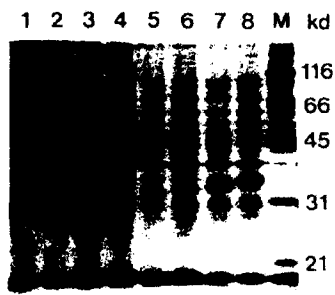
HBV 표면항원 프리-S1 에 KLH 를 결합시켜 생쥐를 면역화한 다음 그 생쥐의 비장세포를 마이엘로마 세포와 융합하고 이로부터 제 1항의 단일클론항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 선별하는 제 2항의 세포주의 제조방법.

청구항 4

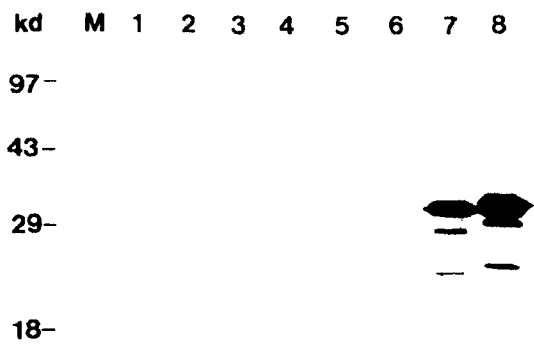
제 1항의 단일클론항체를 adr, adw, ayr, ayw 아형을 포함한 HBV 감염을 예방하고 치료하는데 사용하는 용도.

도면

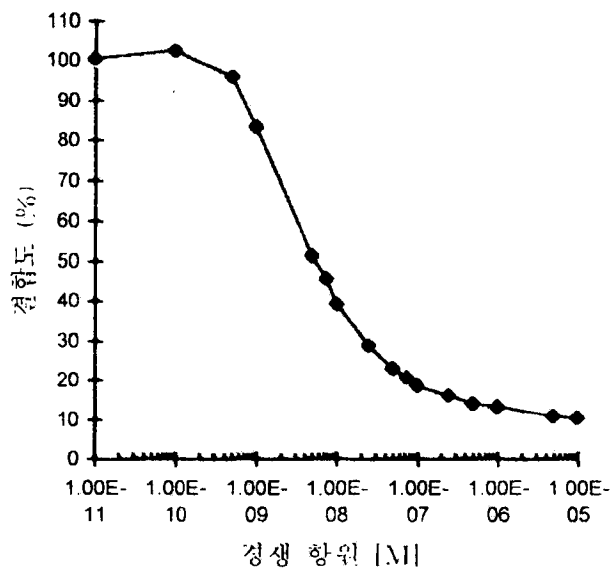
도면 1a



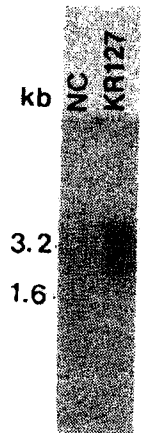
도면 1b



도면 2



도면3



도면4

